

2010/000/B

**厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業**

**特異体質性薬物誘導性肝障害のバイオマーカーの検討  
および予測評価試験系の開発研究**

**平成20年度～22年度 総合研究報告書**

**主任研究者 横井 毅**

**平成23(2011)年5月**

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

特異体質性薬物誘導性肝障害のバイオマーカーの検討

および予測評価試験系の開発研究

平成 20 年度～22 年度 総合研究報告書

主任研究者 横 井 毅

平成 23 (2011) 年 5 月

## 目 次

### I. 平成 20～22 年度 総括研究報告書

特異体質性薬物誘導性肝障害のバイオマーカーの検討および予測評価試験系の  
開発研究

横井 毅 ----- I - XXXIV

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- I - VIII

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 1 - 470

## 特異体質性薬物誘導性肝障害のバイオマーカーの検討および 予測評価試験系の開発研究

主任研究者 横井 毅 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授

ヒトに初めて投与した薬の開発候補化合物が予期せぬ重篤な副作用を発現し、開発が中止になるケースが現在も各社で続いており、さらに発売後多数の患者に投与されて初めて重篤な障害が発現するケースも少なくない。特に薬の代謝を担っている主臓器である肝臓に障害がでる場合が多く、新薬開発にとって大きな痛手となっている。こうしたヒト特異体質性薬物誘導性肝障害の予測試験系の開発・確立が切望されている。FDAは2005年末に、薬物誘導性の肝障害の克服を重点分野研究と位置付けている。さらにFDAは2008年2月に代謝物の安全性試験のガイドラインを発行した。これを受け、我が国でも代謝物の安全性試験、特に肝障害の原因となる活性代謝物の安全性の予測に大きな関心が持たれている。本研究では、特異体質性薬物誘導性肝障害の予測試験系の構築とその評価を可能にすることを目的とした。特に（1）ヒト肝臓における反応性代謝物の生成系を考慮した *in vitro* 細胞スクリーニング試験系と、*in vivo* 試験ラットの作出と評価研究を行うと共に、（2）薬物性肝障害における免疫学的な因子の関与の解析と（3）マイクロRNAの関与について検討を行った。3年間の具体的な研究項目は、

（1）反応性代謝物の検討については、（1-1）CYP2C9発現アデノウイルスを用いた薬物誘導性肝障害の評価、（1-2）ヒトCYP1A2およびCYP2E1による薬物の代謝的活性化の検討、（1-3）CYP3A4発現アデノウイルスを用いた高感度細胞障害検出試験系の構築、（1-4）グルタチオン減少モデルラットにおける薬物誘導性肝障害の検討、

（1-5）ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬物誘導性肝障害に関する研究、（1-6）薬物誘導性肝障害に対するタモキシフェンによる肝保護作用機序、（1-7）ハロタン誘導性肝障害に対する女性ホルモンの影響、（1-8）プロゲステロンによる薬物誘導性肝障害悪化メカニズムの解明などについて、

（2）免疫学的な因子の関与については、（2-1）ハロタンによる肝障害誘導メカニズム、（2-2）ジクロフェナク誘導性肝障害における免疫学的因子の影響、（2-3）ジクロキサリン誘導性肝障害における免疫学的因子の関与、（2-4）免疫学的機序による薬物性肝障害における代謝的活性化の評価、（2-5）免疫学的機序による薬物誘導性肝障害の *in vitro* 評価系の構築などについて、成果を挙げることができた。

（3）マイクロRNAについては、（3-1）ヒト hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  の

microRNA による制御、(3-2) ヒト CYP24 の発現調節における microRNA の役割、(3-3) ヒト肝臓における Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) の microRNA による発現制御、(3-4) ヒト肝臓における CYP2E1 の microRNA による発現制御などについて研究成果を挙げることができ、一部については、研究が進行中であるが、それ以外の全てについて、英文論文として報告を行った。

以上より、過去 3 年間の関連分野の世界的動向と、本研究成果を鑑みて以下のように考える。反応性代謝物の *in vitro* での定量的予測試験系は、最近ほどの製薬会社の研究所でも測定されるようになった。しかし、この手法によっても開発の *go or not go* を決定できないグレーゾーンがあり、明確な予測法の確立は困難であるという認識が一般的になってきた。さらに、実験動物の *in vivo* の実測値と *in vitro* 結果からの予測値が乖離する場合も少なからずあることが認識されてきた。こうした状況において、申請者が報告した、アデノウイルス発現系を用いた実施例は、*in vitro* の高感度で再現性の高い試験系として注目をされてきている。しかし、*in vivo* への適用については、論文発表はできたが、実際的な利用については、アデノウイルスが多量に必要であるという難点があり、一般化には少々ハードルが高いと考えられる。次に、薬物性肝障害における免疫学的因子の関与についてであるが、この研究分野は我々を始め、世界でも極めて少ない研究者が立ち上げを行っている段階である。そのような状況において、申請者は世界に先駆けてハロタン誘導性の肝障害にはインターロイキン(IL)-17 が関与することを 2008 年に発表できた。この反響小さく無く、現在はアセトアミノフェンに並んで、ハロタンに関する論文が急増して来ている。さらに、申請者はジクロキサシリン、ジクロフェナクについて免疫学的因子の関与の論文をだした。これらは、急性肝障害の分野の解決の糸口になるが、ヒトに外挿される亜急性や慢性の毒性については、今後の研究課題であると考えられる。さらに、最近の genome wide association study から報告されている HLA の関与についても、予測試験系への適用については、今後の研究課題である。次に、microRNA については、薬物動態関連の研究が全くなされていない状態であった為に、基礎的な研究を平行しておこなった。基礎的な研究では大変大きな業績を挙げることができた。さらに、肝毒性の惹起する胆汁酸の生合成調節経路の解明と、毒性学的重要性などの多くの情報を発信できたことは、当初の予定を超える成果を挙げることができたと考えている。

分担研究者：金沢大学医薬保健研究域薬学系・准教授 中島美紀

#### A. 研究目的

現在、医薬品創製における大きな障害は、特に多数の患者等被験者を対象とす

る臨床試験段階あるいは市販後において生じる毒性発現である。薬効評価中心で開発段階に移行した医薬品候補化合物について懸念される毒性をいかに早期に予測し、毒性発現回避戦略を進めるかが、毒性・副作用によって製薬企業な

らびの患者がこうむる損失を大きく左右する。安全性に優れた医薬品創製（安全創薬）の推進のためには、過去に生じた重大な毒性のタイプ、頻度、推定されるメカニズム、化合物特性などに基づいて、医薬品の生体への毒性作用に関わるメカニズムの詳細、それに基づいた解析法の樹立とその有用性評価、医薬品開発段階におけるスクリーニング系としての毒性解析ツールの一般化など、多様な観点からのアプローチが必要になる。薬物性肝障害は今日の医薬品開発および臨床における主要な問題の一つであり、米国における急性肝不全の約半数に関与すると言われている。また肝障害との関連が1件以上示唆されている薬物は約1000種類にのぼる。薬物性肝障害は中毒性と特異体質性の大きく2種類類に分類される。中毒性肝障害は薬物の投与量依存的に、ほとんど個体差なく発症するため、非臨床試験による再現が可能であるとされている。一方、特異体質性肝障害は発症の個体差が大きく、発症頻度は100から10万人に1人程度と非常に低いため、医薬品の研究・開発段階で発見されにくい。薬物によっては、上市された後に特異体質性肝障害の発症が報告され、市場から撤退する場合がある。しかし、特異体質性機序による副作用の発症メカニズムに関しては、未だに不明な点が多い。ヒトにおける体内動態を前臨床試験の段階で予測することは極めて困難であり、実際に臨床試験の段階で開発中止となる候補化合物は92%に達し、その原因の約60%は種差に起因するものであると言われている。本研究では、薬物誘導性肝障害の予測試験系の構築を目指して、種差を考慮した試験系の開発研究およびヒト特異的に発症する薬物

誘導性肝障害の機構解明、特に反応性代謝物の関与について研究を行った。

(1) 反応性代謝物の関与については、

(1-1) CYP2C9 発現アデノウイルスを用いた薬物誘導性肝障害の評価; CYP3A4 を過剰発現させるアデノウイルス (AdCYP3A4) は本研究室において既に作製され、*in vitro* において培養細胞株に CYP3A4 を過剰発現させることによる *in vitro* 細胞障害試験系を構築している。そこで本研究では AdCYP3A4 に加え、CYP2C9 を過剰発現させるアデノウイルス (AdCYP2C9) を新たに作製し、CYP2C9 および CYP3A4 を過剰発現させた *in vitro* 細胞障害試験系を構築することにより、CYP2C9 により肝障害性を示す薬物の代謝的活性化または解毒機能を明らかにすることを目的とした。

(1-2) ヒト CYP1A2 および CYP2E1 による薬物の代謝的活性化の検討においては、肝発現量が高く、薬物や発がん性物質の代謝的活性化に関与する報告の多い CYP1A2 および CYP2E1 を発現するアデノウイルス (AdCYP1A2 と AdCYP2E1) を作製し、RNAi により Nrf2 (Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) をノックダウンしたヒト肝癌由来細胞である HepG2 細胞に感染させ、*in vitro* において薬物が CYP による代謝的活性化を受けて生成する活性代謝物の薬物誘導性肝障害を高感度に予測することを目的とした。

(1-3) CYP3A4 発現アデノウイルスを用いた高感度細胞障害検出試験系の構築の研究においては、AdCYP3A4 と AdGCSH-shRNA をラット肝癌由来 H4IIE 細胞に同時感染させ、細胞内における CYP3A4 発現および GSH 含量の減少が認められる実験条件の検討を行った。最適

化された条件において、肝障害を惹起するとの報告がある薬物の細胞障害性を検討した。従来の試験系と比較してより細胞障害に対し高感受性な試験系とすることを目的とし、多くの解毒酵素の遺伝子のノックダウンが及ぼす活性代謝物の細胞障害性への影響について検討した。

#### (1-4) グルタチオン減少モデルラットにおける薬物誘導性肝障害の検討

GSHは、内因性物質や薬物より生じるフリーラジカルを捕獲することで、組織中の核酸やタンパク質を酸化ストレスから保護する役割を有している。グルタチオンS-転移酵素 (GST) は、ヒトに比べげっ歯類で酵素活性が高いことが知られており、この代謝能の違いが前臨床試験における毒性予測を困難にしている原因の一つと考えられている。トログリタゾン、ジクロフェナク、およびフルタミドは前臨床試験で肝障害発症のリスクは認められず、臨床で多くの患者に使用されることにより、一部の患者で重篤な肝障害が報告されている。そこで、GSH減少モデルラットにこれらの薬物を投与することで急性、および亜急性の肝障害の発現について検討した。

(1-5) ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬物誘導性肝障害に関する研究；トログリタゾンはチアゾリジン系の糖尿病治療薬であり、その作用機序は、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) に結合し、インスリン抵抗性を改善させるものと考えられている。画期的な糖尿病治療薬として上市されたが、稀に重篤な肝障害を惹起することが報告され、市場から撤退している。しかし前臨床試験では、サルを含む実験動物でいかなる肝障害も認められていない。ト

ログリタゾンとともに培養したヒト肝細胞およびマイクロソームからはGSHとの複合体が検出されている。トログリタゾンはこれまで、動物モデルを用いた検討において、ヒトにおける肝障害をほとんど再現できていない。そこで、マウス肝の70%以上がヒト肝細胞に置換されたキメラマウスにトログリタゾンを投与することで、トログリタゾンによるヒト特異的な薬物誘導性肝障害の発現とそのメカニズムについて検討した。

(1-6) 薬物誘導性肝障害に対するタモキシフェンによる肝保護作用機序；Estrogen (E2) は Estrogen receptor (ER) に結合し、様々な生態反応に関与していることが知られており、ERにはER $\alpha$ 、ER $\beta$ の2つの subtype が存在する。肝臓において、ER $\alpha$ は高く発現しているが、ER $\beta$ はほとんど発現が認められないことが知られている。ER $\alpha$  agonist である Ethinylestradiol (EE2) の過量投与により、胆汁うっ滞が惹起されることが知られており、ER $\alpha$ は肝障害の発症に関与することが示唆されている。一方で、マウスにおいて薬理用量のE2投与は様々な肝障害を抑制することも報告されている。肝障害の発症とER $\alpha$ の間には関連があることが示唆されているが、薬物誘導性肝障害とER $\alpha$ の関連を示した報告はない。SERM投与による薬物誘導性肝障害への影響に関する報告もなく、また、E2による肝保護の詳細なメカニズムは不明である。そこで本研究ではER $\alpha$ アゴニストとしてE2に比べ安定性が優れるEE2、SERMとしてTAMとRAL、およびER $\alpha$ アンタゴニストとしてICI182.780 (ICI) を前投与することにより、薬物誘導性肝障害に及ぼす影響について検討した。

(1-7) ハロタン誘導性肝障害に対する女性ホルモンの影響：今日、DILI のリスクファクターの一つとして女性が挙げられている。女性は男性に比べ肝細胞障害型の DILI 発症が有意に多いこと、米国において劇症化 DILI が認められた患者の 90% が女性であったこと、および DILI が原因で肝移植を受けた患者の 76% が女性であったことが報告されており、女性では肝移植や死亡を伴う劇症化の頻度が高いことが報告されている。また、米国では DILI に限らず、急性肝障害患者の 74% が女性であることや、アルコール性肝障害も女性において劇症化しやすいことが報告されている。これらの多くの報告から、女性は重篤な肝障害を引き起こすリスクファクターであることが示唆されるが、その原因およびメカニズムについては不明である。性周期においてエストラジオール (E2) やプロゲステロン (Prog) といった女性ホルモン濃度の周期的な変化を伴い、血中女性ホルモン濃度が免疫反応に影響を与えることが報告されているが、現在までに女性ホルモンと DILI との関連性について検討した報告はない。女性ホルモンである E2 と Prog が HAL 誘導性肝障害に与える影響について主としてマウスを用いて検討した。

(1-8) プロゲステロンによる薬物誘導性肝障害悪化メカニズムの解明について；前章での検討より、女性ホルモンである E2 および Prog が HAL 誘導性肝障害の程度に影響を及ぼすことが示された。E2 の肝保護作用については広く研究されているが、Prog と肝障害との関連性についてはほとんど報告されておらず、臨床で重篤な DILI 発症が女性に多いことのメカニズムについては不明

のままである。本章では肝障害悪化作用の認められた Prog に着目し、HAL に加え Thioacetamide (TA)、Dicloxacillin (DCX) および ANIT を用いて、Prog による DILI 悪化のメカニズムを解明することを目的とした。

(2) 免疫学的因子の関与については、

(2-1) ハロタンによる肝障害誘導メカニズム；ハロタンを肝障害の程度と免疫学的なバックグラウンドの異なる 2 種類の系統のマウスに投与し、Th1/Th2 サイトカインの産生能の変動等について評価した。さらに近年脚光を浴びている新たな Th 細胞サブセットである Th17 がハロタン誘導性肝障害に関与することを示唆する実験データが得られた。そこで Th1 および Th2 サイトカインの産生能の変動に加えて、ハロタン誘導性肝障害と IL-17 の関与についての検討も併せて行った。

(2-2) ジクロフェナク (DIF) 誘導性肝障害における免疫学的因子の影響；ジクロフェナクは非ステロイド性消炎鎮痛剤の一種であり、解熱鎮痛薬として臨床で広く用いられている。ジクロフェナクは肝障害を引き起こすことが知られており、軽度または無症候性な症例を含めると約 15% の患者において血清中のトランスアミナーゼの上昇が認められること、さらに稀に重篤な肝障害を惹起することが報告されている。ラットに対し Lipopolysaccharide (LPS) とジクロフェナクを併用投与すると肝障害の増悪が認められること、およびジクロフェナクの服用により肝障害を発症した患者において、肝細胞壊死、血中における自己抗体の検出、肝組織へのリンパ球の浸潤および炎症を伴う場合が多く認められることから、ジクロフェナク誘導性肝

障害に免疫学的因子を介した反応が関与することが疑われているが、その機序については未だに明らかにされていない。本研究はジクロフェナク誘導性肝障害の発症に対する免疫学的因子の関与について明らかにすることを目的として検討を行った。

(2-3) ジクロキサシリン誘導性肝障害における免疫学的因子の関与；抗菌薬であるジクロキサシリンは胆汁うっ滞を伴う肝障害を惹起することが知られている。処方後1週間以内に肝障害を引き起こす場合が多く、発熱や好酸球の増多などのアレルギー症状を伴う患者も多い。C57BL/6 マウス、Balb/c マウスの両方で、フルタミド投与後の血漿生化学値を測定し、肝臓における炎症および免疫に関与する転写因子およびサイトカイン類の mRNA の定量、血中 IL-4 の測定を行った。また、rIL-4 または DK-PGD<sub>2</sub> 併用投与による影響を検討し、免疫学的因子の関与を明らかにすることを目的とした。

(2-4) 免疫学的機序による薬物性肝障害における代謝的活性化の評価；これまでに免疫学的な肝障害に関与する代謝的活性化を評価した報告はない。本研究では、代謝的活性化を介した反応性代謝物による免疫活性化を評価することを目的とした。初めに、THP-1細胞の免疫因子の変動を指標とし、活性代謝物による代謝的活性化を評価可能な試験系を構築し、様々な肝障害性薬物におけるCYP3A4による代謝的活性化の評価を行った。

(2-5) 免疫学的機序による薬物誘導性肝障害の *in vitro* 評価系の構築；薬物の曝露により生体内の免疫機構が活性化されると、過剰な免疫反応に伴う炎

症ストレスが特異体質性に発現し、肝障害の発症原因となると考えられている。薬物や化合物による免疫反応を評価するヒト *in vitro* 試験系としては、ヒトの末梢血から単離した単核球やT細胞、B細胞などを用いることが多い。しかし、ヒト末梢血から調製する試料の使用では、ロット間の個体差や、コストの問題が生じるため、*in vitro* の大規模スクリーニングには適さない。近年、このような問題を回避した *in vitro* 評価系として、ヒト単球系細胞株の有用性が注目されている。ヒト単球系細胞株は、単球やマクロファージ、骨髄球などの免疫担当細胞における分化や活性化のメカニズム解明に頻用されている細胞株である。そこで、上記のヒト単球系細胞によるIL-8およびTNF $\alpha$ タンパク質産生能を炎症反応の指標とし、テルビナフィンおよびその類似薬がヒト単球細胞による炎症性サイトカイン、ケモカインのタンパク質産生量を増加させるかを検討した。さらに、THP-1細胞の炎症性サイトカイン産生増加に対するMAPK経路の寄与を明らかとすることを目的とした。

(3) マイクロRNAに関する研究については、

(3-1) ヒト hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  の microRNA による制御は、代謝酵素の発現や細胞周期を調節している。本研究では核内受容体の発現制御および代謝酵素の発現への microRNA の関与を解明することを目的とした。ヒト hepatocyte nuclear receptor (HNF) 4 $\alpha$  を中心に検討した。

(3-2) ヒト CYP24 の発現調節における microRNA の役割についての研究では CYP24 の過剰発現に miRNA による発現調節が関与しているか明らかにすること

を目的とした。

(3-3) ヒト肝臓における Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) の microRNA による発現制御:

Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) はステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属しているリガンド依存的な転写因子である。PPAR $\alpha$  は主に肝臓に発現しており、その他にも腎臓、心臓、筋肉などにも発現が認められる。内因性リガンドとして脂肪酸やエイコサノイド、また外因性リガンドとしてフェノフィブラートやベザフィブラートといったフィブラート系薬剤が結合すると retinoid X receptor (RXR) とヘテロダイマーを形成する。

UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A9 や UGT2B4 といった第 II 相薬物代謝酵素の発現も上昇させることが知られている。このように PPAR $\alpha$  は脂質代謝や異物代謝において中心的に働く遺伝子を制御する役割を担っている。肝臓における常在的な PPAR $\alpha$  の発現と miRNA の関係については不明である。本研究では、肝臓での PPAR $\alpha$  の発現調節メカニズムとして miRNA の関与の可能性を検討した。

(3-4) ヒト肝臓における CYP2E1 の microRNA による発現制御: CYP2E1 は主に肝臓に発現しており、肺や胎盤においても発現が認められる。CYP2E1 は比較的分子量の小さい化合物を基質とし、アセトアミノフェンやイソニアジドなどの薬物、エタノールやアセトン、四塩化炭素などの有機溶媒や、ニトロソアミン類などの癌原性物質など、数多くの化合物の代謝に関与し、薬理学的だけでなく毒性学的にも極めて重要な P450 分子種の 1 つである。基質となるイソニアジ

ドやエタノールにより CYP2E1 自身が誘導され、その代謝が促進することが知られている。ヒト P450 分子種のほとんどは、生体外異物や内因性物質により誘導されるが、それは化合物がリガンドとなり核内レセプターを活性化し転写を促進する、という転写レベルでの調節機構によるものである。しかし、CYP2E1 の誘導にはそのような核内レセプターは作用しない。CYP2E1 タンパク質の増加には、CYP2E1 mRNA の増加が伴わないと報告されており、CYP2E1 誘導メカニズムとして、mRNA やタンパク質の安定化などの転写後調節が関与していることが示されている。本研究では、ヒト CYP2E1 の発現調節における miRNA の役割を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

Short hairpin RNA (shRNA) の発現手法、ヒト CYP 3A4、CYP1A2、CYP2E1、CYP2C9 の発現ベクターの作成、microRNA の発現ベクターの作成および細胞への感染実験、ラットへの投与実験などは全て、これまでに申請者らが確立した方法および常法に従って行った。その他、マウスを用いたハロタンの免疫毒性に関する研究手法や様々な研究手法は詳細に各分担報告書に記載をした。

(倫理面への配慮)

アデノウイルスを用いた全ての実験は、遺伝子組換え実験安全委員会による承認を受けて行った。本検討における動物実験は、金沢大学動物実験指針に従って、承認を受けた後に行った。本研究で用いたヒト肝ミクロゾーム、ヒト肝 RNA などのヒト由来試料は、全て市販品として入手できるものを用いており、倫理委員会の申請対象とならないことを確認済で

ある。

### C. 研究結果

(1-1) CYP2C9 発現アデノウイルスを用いた薬物誘導性肝障害の評価研究；CYP2C9 で代謝的活性化を受けることが報告されているベンズブロマロン、チエニル酸およびジクロフェナクが CYP2C9 により細胞障害性が増強することを本試験系で示した。新たにロサルタンでは CYP2C9、チエニル酸では CYP3A4、アミオダロンでは CYP2C9 と CYP3A4 が毒性発現に関与し、テルビナフィンとフルバスタチンは CYP3A4 が毒性に関与するが、CYP2C9 により解毒されることを明らかにした。また、GST(グルタチオン S-転移酵素)などの解毒酵素を発現誘導する Nrf2 ( Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) をノックダウンすることによりさらに細胞生存率が低下したことから、Nrf2 の下流遺伝子の解毒への関与を明らかにし、同時に細胞障害性のより高感度な検出を可能とした。

(1-2) ヒト CYP1A2 および CYP2E1 による薬物の代謝的活性化の検討；肝発現量が高く、薬物や発がん性物質の代謝的活性化に関与する報告の多い CYP1A2 および CYP2E1 を発現するアデノウイルス (AdCYP1A2 と AdCYP2E1) を作製し、RNAi により Nrf2 (Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) をノックダウンしたヒト肝癌由来細胞である HepG2 細胞に感染させ、*in vitro* において薬物が CYP による代謝的活性化を受けて生成する活性代謝物の薬物誘導性肝障害を高感度に予測する系を構築した。アセトアミノフェンやトルカポンの細胞障害性を感度良く検出できる *in vitro* 試験系を構築した。この試験系により、新たに

フルタミドとレフルノミドの肝障害に CYP1A2 および CYP2E1 が関与することを見出した。

(1-3) CYP3A4 発現アデノウイルスを用いた高感度細胞障害検出試験系の構築；ヒト肝に多く発現している薬物代謝酵素、CYP3A4 を肝特異的に発現するアデノウイルスを用い、ラット肝癌由来細胞、およびヒト肝癌由来細胞に発現させた。さらに、ノックダウンアデノウイルスや siRNA を用いた手法により細胞内 GSH 含量を減少させることで、肝障害報告がある種々の薬物の細胞障害性が増強されることを見出し、細胞障害性の増強が幾つかの薬物において認められ、活性代謝物の障害性に対してより高感度な試験系を構築することができた。

(1-4) グルタチオン減少モデルラットにおける薬物誘導性肝障害の検討  
ジクロフェナクについては、単回投与の検討においては、GSH 減少モデルラットでのみ 100 mg/kg の投与で肝障害が認められた。しかし、肝組織像での検討で変化は認められなかった。単回投与の検討結果から、GSH 減少モデルラットはジクロフェナクによる急性の肝障害を高感度に検出できることを示した。フルタミドについては、単回投与の検討においては、GSH 減少モデルラットでのみ 1,000 および 1,500 mg/kg の投与で肝障害が認められた。500 mg/kg の投与では GSH 減少モデルラットおよび AdLuc-shRNA 投与ラットともに肝障害が認められなかった。連続投与の検討においては、GSH 減少モデルラットでのみ 500 mg/kg の投与で肝障害が認められた。

(1-5) ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬物誘導性肝障害に関する研究

キメラマウスにおけるトログリタゾン投与実験を行った結果、GSH 減少モデルラットでは認められなかった肝障害マーカーの上昇傾向が認められ、さらに、薬物動態関連因子や酸化ストレスの変動なども認められた。キメラマウスがよりヒトに近い毒性プロファイルを持ち、トログリタゾン誘導性肝障害を明確に再現できる可能性を示唆した。

(1-6) 薬物誘導性肝障害に対するタモキシフェンによる肝保護作用機序；薬物誘導性肝障害に対する種々のエストロゲン関連化合物の肝保護作用を検討した。Ethinylestradiol (EE2)、Tamoxifen (TAM) および Raloxifene (RAL) の前投与により TA 誘導性肝障害の軽減が認められ、特に TAM で顕著であった。ICI 182,780 (ICI) の前投与では軽減は認められなかった。DNA マイクロアレイ解析の結果、monocyte to macrophage differentiation-associated 2 (Mmd2) の発現が TAM により顕著に誘導された。Mmd2 に対する siRNA (siMmd2) をマウス尾静脈内に投与することにより肝 Mmd2 mRNA の約 70% の減少が得られ、さらに TA 誘導性肝障害の増強および TAM による肝保護作用の減弱が認められた。また、ERα KO マウスにおいては TAM による Mmd2 mRNA の誘導は認められず、肝保護作用も認められなかった。Mmd2 による肝保護作用メカニズムの一つとして、Areg を上昇させることによる肝再生促進が考えられた。

(1-7) ハロタン誘導性肝障害に対する女性ホルモンの影響：E2 および Prog 前投与による HAL 誘導性肝障害への影響を 8 週齢雌性 BALB/c マウスを用いて検討した。その結果、CTL と比較して

HAL 30 mmol/kg 投与により有意な ALT 値の上昇が認められた。E2 前投与により HAL (30 mmol/kg) 単独投与群と比較して有意な ALT 値と AST 値の減少が認められ、その肝障害減弱作用は ER アンタゴニストである ICI の併用により認められなくなった。また、HAL 15 mmol/kg 投与では CTL と比較して、ALT 値および AST 値に増加傾向が認められた。Prog 前投与により HAL (15 mmol/kg) 単独投与群と比較して有意な ALT 値と AST 値の増加が認められ、その肝障害悪化作用は PR アンタゴニストである RU の投与により認められなくなった。また、E2、Prog、ICI および RU 単独投与のみでは血漿トランスアミナーゼ値の上昇は認められなかった。また、血漿トランスアミナーゼ値と同様に肝組織学的評価においても、E2 による肝障害減弱および Prog による肝障害悪化が認められた。E2 前投与時の HAL 投与においては、HAL 投与群と比較して炎症関連因子の有意な減弱が認められ、これらの E2 の作用は ER アンタゴニストである ICI の投与により認められなくなった。以上の結果から、E2 投与単独では炎症関連因子に有意な変化は認められなかったが、E2 前投与は HAL 投与後の炎症反応の有意な減弱を示すことが認められた。Prog 単独投与において CXCL1 の有意な mRNA 発現増加が認められ、さらに Prog 前投与により HAL 投与後の炎症反応に顕著な変化を示すことが認められた

(1-8) プロゲステロンによる薬物誘導性肝障害悪化メカニズムの解明について：前章において、Prog が肝障害悪化作用を有することが示唆されたことから、そのメカニズムを解明することを目的として検討を行った。HAL だけでなく他の

肝障害性化合物においても Prog 投与による肝障害悪化作用が認められ、これらは CXCL1 を初めとする免疫因子の活性化を介していることを見出した。さらに、これらの免疫因子の活性化には ERK 経路の活性化や、クッパー細胞が関与し、Prog による肝障害悪化に寄与していることが示された。また、PR のアンタゴニストである RU を肝障害惹起後に投与した際にも、HAL 誘導性肝障害を減弱させることを示した。本研究では、女性ホルモンが薬物誘導性肝障害の程度に影響を与えることを示した。また、Prog が ERK 経路やクッパー細胞を介して薬物誘導性肝障害の悪化に寄与することを初めて明らかにし、これらの女性ホルモンが薬物誘導性肝障害の性差メカニズムの一因になりうる可能性を示した。

(2-1) ハロタンによる肝障害誘導メカニズム;ハロタンによる肝障害モデル動物の作成し、様々な転写因子や IL を測定した結果 IL-17 が主たる役割を果たすことを明らかにした。さらに、抗 IL-17 抗体による IL-17 の中和は MIP-2 の発現を抑制し、肝障害を軽減することが明らかとなった。

(2-2) ジクロフェナク誘導性肝障害における免疫学的因子の影響;ジクロフェナクを 80 および 120 mg/kg で投与した群の 24 時間後の血漿中 ALT 値および AST 値は対照群と比較して有意な上昇が認められた。また、肝実質細胞に多数の MPO 陽性細胞の浸潤が認められた。対照群と比較してジクロフェナク投与マウスにおいて血漿中 IL-17 の有意な増加が認められた。MCP-1 はジクロフェナク投与後 6 および 12 時間において有意な増加が認められ、24 時間においては有意ではないが増加が認められた。

MCP-1 の発現量は投与時間依存的な増加を示した。CXCL1 はジクロフェナク投与後 6、12 および 24 時間のいずれにおいても対照群と比較して有意な増加が認められた。ジクロフェナク単独投与群と比較して rIL-17 併用投与により血漿中 ALT 値の増加が認められた。

(2-3) ジクロキサシリン誘導性肝障害における免疫学的因子の関与; ジクロキサシリン誘導性肝障害の発症には IL-4 などの Th2 因子の関与が示唆された。DK-PGD<sub>2</sub> 併用投与により肝障害の増悪が認められ、GATA-3 や MIP-2 mRNA の上昇が認められ、組織染色でもジクロキサシリン単独投与群では認められなかったネクロシスが認められた。薬物投与 6 h 後において、ALT 値および IL-4 値の上昇が認められた。IL-4 は ConA 誘導性肝障害に関与することは報告されているが、薬物誘導性肝障害への関与の報告は未だに無く、薬物誘導性肝障害に IL-4 が関与することを示した最初の結果である。

(2-4) 免疫学的機序による薬物性肝障害における代謝的活性化の評価;アミオダロン (AMD) およびデスエチルアミオダロン (DEA) 処置において、コントロールマイクロソーム処置群に比べて CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群で CD54 発現量の有意な増加が認められた。アルベンダゾール処置において、コントロールマイクロソーム処置群に比べて CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群で CD86 発現量の有意な増加が認められた。一方、その他の薬物ではコントロールマイクロソーム処置群と CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群の間に CD 発現量の顕著な変動は認められなかった。また、CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群で

の AMD 処置 24 時間後、DEA は 11.7  $\mu\text{M}$ 、DiDEA は 0.4  $\mu\text{M}$  生成した。CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群での DEA 処置 12 時間後、DiDEA は 0.3  $\mu\text{M}$  生成した。CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群での DEA 処置 24 時間後、DiDEA は 0.5  $\mu\text{M}$  生成した。一方、コントロールマイクロソーム処置群においては、いずれの条件においても代謝物は検出されなかった。

(2-5) 免疫学的機序による薬物誘導性肝障害の *in vitro* 評価系の構築 テルビナフィンまたはブテナフィン処置により、THP-1 細胞および HL-60 細胞の IL-8 および TNF  $\alpha$  タンパク質産生量の増加が認められた。さらに、PMA により分化させたマクロファージ様 THP-1 細胞においても、テルビナフィン処置により TNF  $\alpha$  タンパク質産生量の増加が認められた。これより、テルビナフィンはヒト単球系細胞やマクロファージによる炎症性サイトカインおよびケモカインの産生を刺激し、炎症反応を惹起させる作用を有することが示唆された。テルビナフィンは THP-1 細胞の ERK1/2 および p38 MAPK 経路を活性化させること、テルビナフィンの処置による THP-1 細胞の IL-8 および TNF  $\alpha$  産生増加には、ERK1/2 経路が重要な役割を果たすことが示された。

(3-2) ヒト CYP24 の発現調節における microRNA の役割の研究では、CYP24 の MRE125b に miR-125b が機能的に作用することが明らかになった。さらに、miR-125b が内因性の CYP24 に対しても機能することを明らかにした。MCF-7 細胞に pre-miR-125b を導入することで CYP24 タンパクが減少し、KGN 細胞に AsO を導入することで CYP24 タンパクが増加した。このとき CYP24 mRNA の変動はタンパクとは異なる挙動を示したこと

から、CYP24 は転写後調節を受けたことが示され、miR-125b は内因性の CYP24 の発現調節に関与することが明らかになった。

(3-3) ヒト肝臓における Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) の microRNA による発現制御：pre-miR-21 および pre-miR-27b の導入により、ヒト肝癌由来 HuH7 および HepG2 細胞において PPAR $\alpha$  タンパク質発現量が低下することを見出した。その際、PPAR $\alpha$  mRNA 発現量は変化しなかったことから、miR-21 および miR-27b は PPAR $\alpha$  を翻訳抑制により制御することが示された。さらに pre-miR-21 および pre-miR-27b の導入により、PPAR $\alpha$  の下流遺伝子である ACS mRNA の常在的発現量の減少およびリガンドによる ACS mRNA の誘導の消失が認められ、一方 AsO-miR-21 および AsO-miR-27b の導入により誘導された ACS mRNA のさらなる上昇が認められた。このことから miR-21 および miR-27b が PPAR $\alpha$  の下流遺伝子にも影響することが示された。内因性の miR-27b のノックダウンによって PPAR $\alpha$  タンパク質発現量が増加したことから、miR-27b もヒト肝臓中における PPAR $\alpha$  の常在的な発現に寄与していると考えられる。これまでに PPAR $\alpha$  の発現制御に関して miRNA の関与が示唆されつつあるが、ヒト肝臓における常在的な PPAR $\alpha$  の発現と miRNA の関係については不明であった。

(3-4) ヒト肝臓における CYP2E1 の microRNA による発現制御：HEK293 細胞に Pre-miR-378 の導入により pGL3/c-378 ではコントロールの 35% まで活性が低下し、導入した pre-miRNA が細胞内で働いていることが確認され、

MRE378 が機能的であることが示唆された。HEK293/2E1+UTR 細胞において、pre-miR-378 導入により、CYP2E1 タンパク質発現量はコントロールに比べ有意に低下した (60%)。しかし、HEK293/2E1 細胞においては、CYP2E1 タンパク質発現量の変動は認められなかった。従って、MRE378 を含む 3'-UTR の存在が miR-378 による CYP2E1 の発現抑制に役割を果たしていることが示された。酵素活性を評価することによっても、pre-miR-378 による CYP2E1 タンパク質発現量の低下が示された。miR-378 による CYP2E1 mRNA 発現量の低下が、mRNA 分解の亢進によるものかどうか

#### D. 考察

(1-1) CYP2C9 発現アデノウイルスを用いた薬物誘導性肝障害の評価研究。新たにロサルタンでは CYP2C9、チエニル酸では CYP3A4、アミオダロンでは CYP2C9 と CYP3A4 が毒性発現に関与し、テルビナフィンとフルバスタチンは CYP3A4 が毒性に関与するが、CYP2C9 により解毒されることを明らかにした。また、GST などの解毒酵素を発現誘導する Nrf2 をノックダウンすることによりさらに細胞生存率が低下したことから、Nrf2 の下流遺伝子の解毒への関与を明らかにし、同時に細胞障害性のより高感度な検出を可能とした。

(1-2) ヒト CYP1A2 および CYP2E1 による薬物の代謝的活性化の検討。本試験系において、アセトアミノフェン、トルカポン、クロザピンにおいて、CYP1A2 によって細胞障害性が高くなった。レスルノミドにおいては、CYP2E1 によって細胞障害性が高くなることを示した。デシプラミン、ピラジナミド、フェルバメート、ダブソン、ペモリン、メチルドパ、

調べるため、CYP2E1 mRNA の安定性に及ぼす pre-miR-378 の影響を検討した。miR-378 による翻訳抑制がヒト肝における CYP2E1 の常在的な発現に寄与していることが示唆された。mature miR-378 と CYP2E1 mRNA の相関について検討した結果から両者の間に逆相関が認められなかった ( $r = 0.31, p = 0.13$ ) ことから、miR-378 の CYP2E1 mRNA の分解への影響ばかりでなく、CYP2E1 の転写活性への影響の可能性も低いと考えられる。このことより、miR-378 は主に翻訳抑制に寄与していることが示唆された。

スルファメトキサゾールでは CYP1A2 および CYP2E1 による有意な細胞生存率の低下は認められなかった。これらの薬物では肝障害報告があるものの、CYP1A2 および CYP2E1 が毒性に関与するという報告は現在のところ存在しない。これらの薬物の肝障害発現メカニズムには CYP1A2 および CYP2E1 以外の代謝酵素が関与していることや、もしくは薬物自体が高濃度になることで細胞障害性を示すことが考えられる。

(1-3) CYP3A4 発現アデノウイルスを用いた高感度細胞障害検出試験系の構築。トログリタゾン、フルタミド、アセトアミノフェン、クロザピンは AdCYP3A4 と siGCSH および siNrf2 の同時処置において初めて細胞障害性の増強が認められた。Nrf2 周辺遺伝子の発現に対する効果は、種々の Nrf2 活性化剤、Nrf2 ノックダウンレベル、またはノックアウト等の影響によって異なる。従って、今回 Nrf2 減少状態にある HepG2 細胞で細胞障害性が増強されるという背後には、Nrf2 減少状態下で種々の薬物および

CYP3A4 による活性代謝物が暴露されることに起因する複雑な遺伝子発現変動があると考えられる。

(1-4) グルタチオン減少モデルラットにおける薬物誘導性肝障害の検討；トログクロフェナク、およびフルタミドの薬物により惹起される肝障害を評価できる動物モデルは報告されていない。今回の GSH 減少モデルラットは、通常の実験動物で障害性が認められない用量で被験薬の障害性を検出可能であることを示した。本章において、GSH 減少モデルラットがジクロフェナクおよびフルタミドの肝障害を高感度に検出できることを示し、これらの薬物の解毒に GSH が関与していることを明らかにした。今後、安全性研究において GSH 減少モデルラットを用いることで、急性および亜急性の薬物誘導性肝障害を高感度に検出することに本モデルラットが貢献できると考えられる。

(1-5) ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬物誘導性肝障害に関する研究；キメラマウスを用いることによってトログリタゾン投与による肝障害マーカーの上昇傾向が認められ、キメラマウスがヒトと類似した毒性プロファイルを示すことが強く示唆された。トログリタゾンは、実験動物を用いた検討においてその障害性をほとんど再現できていない。本キメラマウスは最高で95%の肝実質細胞をヒト肝細胞に置換可能である画期的なマウスである一方、肝実質細胞以外はマウス由来であり、種差を完全に克服することはできていない。しかし、トログリタゾン投与によっては ALT 値を含む肝障害マーカーの上昇傾向が認められ、薬物動態関連因子や酸化ストレスの変動なども認められた。よって本研究は、

ヒト特異的なトログリタゾン誘導性肝障害の発現メカニズムを解明し、医薬品開発に貢献できる情報を提供するものと考えられる。

(1-6) 薬物誘導性肝障害に対するタモキシフェンによる肝保護作用機序；本研究では薬物誘導性肝障害に対して EE2、TAM および RAL が肝保護的に働くことを見出し、その作用が ER $\alpha$  を介し、Mmd2 を上昇させることで起こることを示した。薬物誘導性肝障害と ER $\alpha$  との関連性を示した報告はなく、本研究が初めてである。TA 投与量依存的に Mmd2 mRNA は減少し (Fig. 8A)、また、APAP、DIC 投与においても減少が認められた。肝障害が惹起されることで Mmd2 発現量が減少することが示唆された。BB においては肝障害性が低かったために Mmd2 mRNA の減少が認められなかったと考えられる。詳細なメカニズムは不明であるが、Mmd2 が肝障害を感知し、肝保護作用を引き起こす可能性が考えられた。

(1-7) ハロタン誘導性肝障害に対する女性ホルモンの影響；本研究では E2 前投与では変化はほとんど認められず、Prog 前投与では有意な ALT 値の上昇が認められた。したがって、E2 前投与時の投与量は HAL 単独で顕著な ALT 値の増加が認められる 30 mmol/kg、Prog 前投与時は 15 mmol/kg で投与した。その結果、E2 投与は HAL 誘導性肝障害を減弱し、Prog 投与は肝障害を悪化させる結果が得られ、さらにレセプターアンタゴニストを用いた検討からこれらの影響にはそれぞれのレセプターを介することが示唆された。薬物誘導性肝障害では免疫システムの活性化が重要な因子の一つであることが示唆されており、HAL によってリジン残基を修飾されたタン

パク質がクッパー細胞に取り込まれ、免疫細胞に抗原として提示されることでアレルギー反応による肝細胞壊死が起こり肝障害が誘導されると考えられている。本検討においても炎症性サイトカインである TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  および IL-6、好中球遊走に関わる CXCL1 および CXCL2、ICAM-1 mRNA の発現と肝障害の程度が相関する結果が得られた。また本検討と同様の HAL 投与において TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 や好中球の遊走に関わるケモカインである CXCL1 の mRNA の発現量が BALB/c マウスの肝臓において有意に増加することが報告され、好中球が HAL 誘導性肝障害に重要な役割を有することが報告されている。本検討における MPO 陽性細胞の浸潤も肝細胞傷害の程度を決定するのに寄与していると考えられる。

(1-8) プロゲステロンによる薬物誘導性肝障害悪化メカニズムの解明について：本研究では、Prog が肝障害悪化作用を有することが示唆されたことから、そのメカニズムを解明することを目的として検討を行った。HAL だけでなく他の肝障害性化合物においても Prog 投与による肝障害悪化作用が認められ、これらは CXCL1 を初めとする免疫因子の活性化を介していることを見出した。さらに、これらの免疫因子の活性化には ERK 経路の活性化や、クッパー細胞が関与し、Prog による肝障害悪化に寄与していることが示された。また、PR のアンタゴニストである RU を肝障害惹起後に投与した際にも、HAL 誘導性肝障害を減弱させることを示した。さらに、本研究では、女性ホルモンが薬物誘導性肝障害の程度に影響を与えることを示した。また、Prog が ERK 経路やクッパー

細胞を介して薬物誘導性肝障害の悪化に寄与することを初めて明らかにし、これらの女性ホルモンが薬物誘導性肝障害の性差メカニズムの一因になりうる可能性を示した。さらに、肝障害惹起後の RU 投与により肝障害減弱が認められたことから、薬物誘導性肝障害に対する新たな治療手段になりうることを期待される。

(2-1) ハロタンによる肝障害誘導メカニズムの研究では、血漿中の IL-17 タンパク質、肝臓中の TNF $\alpha$  および MIP-2 の mRNA は、Th1 と Th2 の変動の後で誘導されており、ハロタンによる IL-17、TNF $\alpha$  および MIP-2 の誘導は Th1 と Th2 の影響を受けている可能性が示唆された。また抗 IL-17 抗体を用いた検討によってハロタンによる肝障害の誘導に対して IL-17 が寄与することが明らかとなった。IL-17 を主に産生する Th17 の系統差の存在は明らかとはされていないが、BALB/c マウスと C57BL/6 マウスのハロタンに対する感受性の違いは Th17 の応答性に系統差があることを示唆している。また血清中の IL-17 がヒトにおける急性肝障害の有用なマーカーとなり得ることが報告されており、肝障害に対する IL-17 の重要性を支持している。しかし Th17 の分化についてヒトとマウスとは完全に異なっていると言われており、この他にも Th17 の性質については様々な種差の存在が報告されている。よって実験動物で得られた結果をヒトへ外挿する場合にはこのような種差に関して考慮しなければならないと考えられる。IL-17 の上流には stat-3 や ROR $\gamma$ t などの転写因子や核内受容体があり、下流には p38 MAPK、ERK、C/EBP、NF- $\kappa$ B および AP-1 など様々な

経路が存在しており、遺伝子の発現を調節している。また p38 MAPK と NF- $\kappa$ B は IL-10 ノックアウトマウスにハロタンを投与することで活性化されることがわかっている。これらの経路のハロタンによる肝障害への寄与が考えられる。IL-17 に関連する様々な因子について検討することで様々な肝障害のメカニズムが明らかになるのではないかと考えられる。

(2-2) ジクロフェナク誘導性肝障害における免疫学的因子の影響；本研究は、ジクロフェナク誘導性肝障害における免疫学的因子の関与について詳細に検討した初めての報告である。IL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカインや MCP-1、MIP-2 および CXCL1 などの好中球の浸潤に関与するケモカインの mRNA 発現上昇が認められた。IL-1 $\beta$ は、内皮細胞、単球およびマクロファージなどから放出される炎症性サイトカインであり、自然および獲得系の免疫応答に関与し、様々な自己免疫疾患の発症の一因であると考えられている。また、MCP-1、MIP-2 および CXCL1 はクッパー細胞、好中球、単球および内皮細胞などから放出され、炎症部位への免疫細胞の浸潤に関与することが知られている。中でも MIP-2 は好中球の遊走作用が強く、ハロタン誘導性肝障害においても顕著な上昇が認められている。これら MIP-2 などのケモカインの上昇により、ジクロフェナク投与後の肝組織において好中球の浸潤が認められた可能性が考えられる。骨関節炎を発症した患者がジクロフェナク誘導性肝障害を発症するケースが多い一因として、関節炎などの病態により生体内の IL-17 などの炎症性サイトカイン量が比較的に高い状態にある場合、肝障害に

伴う炎症反応が強く惹起され、重篤な肝障害発症に至る可能性が考えられた。さらに、免疫学的因子の SNP がジクロフェナク誘導性肝障害の発症に関与していることも genome-wide association study (GWAS) での検討により明らかにされており、主に Regulatory T cell (Treg) から産生される抗炎症性サイトカインである IL-10 の転写活性が低下しているヒトでは、変異を持たないヒトと比較してジクロフェナク誘導性肝障害を 3 倍程度引き起こしやすいことが報告されている。このことから、免疫応答における個体差がジクロフェナク誘導性肝障害の発症に関与してくること、また、IL-17 だけでなく IL-10 などを含まれた複数のサイトカインによりジクロフェナクによる炎症反応が制御されていることが考えられる。IL-17 を始めとする炎症性因子は NK、NKT 細胞、樹状細胞および単球などの複数の免疫細胞から産生される。肝臓内の免疫応答のネットワークは非常に複雑なものであり IL-17 だけでなく IL-6 および IL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカインやケモカインの mRNA の発現量の増加も認められていることから、様々な免疫学的因子がジクロフェナク誘導性肝障害を発症する一因になることが考えられる。

(2-3) ジクロキサシリン誘導性肝障害における免疫学的因子の関与；本研究ではジクロキサシリン誘導性肝障害の発症に IL-4 などの Th2 の因子が関与することを示し、DK-PGD<sub>2</sub> 投与がジクロキサシリン肝障害を増悪させることを見出した。本研究は薬物誘導性肝障害に IL-4 の関与を初めて示したものである。また、DK-PGD<sub>2</sub> が Th2 因子の関与する肝障害を増悪させることを示した最初の

報告である。DK-PGD<sub>2</sub>を併用投与した場合はGATA-3の上昇が認められていることから、肝臓でのTh2細胞数が上昇し、IL-4を放出したことで血漿中のIL-4濃度も上昇したと考えられる。DK-PGD<sub>2</sub>投与によりジクロキサシリンによる肝障害が増悪したことから多数の免疫系細胞の浸潤が認められたこと、DK-PGD<sub>2</sub>併用投与は免疫学的な因子が関与する薬物誘導性肝障害を*in vivo*で高感度に検出する方法の1つになり得るかもしれない。

(2-4) 免疫学的機序による薬物性肝障害における代謝的活性化の評価；AMDおよびその代謝物について代謝的活性化を介した免疫学的因子と肝障害との関連性を示した報告はない。今回の検討では、AMD濃度20 μMおよびDEA濃度10 μMから炎症性サイトカイン産生量の有意な増加が認められた。アミオダロン誘導性肝障害における免疫学的機序の重要性を裏付ける結果が示されたと考えられる。また、CYP3A4は臨床で使用されている薬物によって誘導される分子種でもあり、また酵素活性には個体差が認められている。従って、高用量で長期間服用する可能性があるAMDについては、CYP3A4による代謝的活性化が肝障害の原因として重要かもしれない。

(2-5) 免疫学的機序による薬物誘導性肝障害の*in vitro*評価系の構築；ヒト単球系細胞の炎症性サイトカイン産生能を評価することは、免疫学的機序による薬物性肝障害の予測に有用であることを示したと考えられる。本研究では、テルビナフィンヒト単球系細胞を活性化し、IL-8およびTNF $\alpha$ の産生を増加させることを明らかとした。単球やマク

ロファージによる炎症性サイトカインやケモカインの産生は、生体内における炎症反応を惹起するため、テルビナフィンの投与により生じる炎症反応は、肝障害発症の原因のひとつであると考えられる。

(3-1) ヒト hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ のmicroRNAによる制御は、代謝酵素の発現や細胞周期を調節している。HNF4 $\alpha$ は多くの核内転写因子や酵素類の発現調節に関与している。HNF4 $\alpha$ はをノックアウトすると肝の形態も機能も大きく損傷を受ける。HNF4aは組織の分化や極めて多くの代謝pathwayの恒常性を保ために重要であると言われている。本研究では、miR-24とmiR-34aがHNF4 $\alpha$ を負に調節していることを見いだした。miR-24は細胞の増殖などに色々な影響を及ぼすと考えられる。miR-24とmiR-34aは、多くのターゲット蛋白のグローバルネットワークにより細胞増殖を調節しているのであろう。CYP7A1のデータから、miR-24とmiR-34aは胆汁酸の生合成に関わっていることが示された。さらに興味深いことに、これらのmicroRNAはPKC/MAPK activatorやROS generatorで制御されていることが示されたことであり、これは胆汁酸生合成の新規の制御機構である。以上、本研究では、ヒトHNF4aはmiR-24およびmiR-34aによって負に制御され、細胞ストレスや代謝酵素の発現など広範な影響を及ぼしていることを明らかにした。

(3-2) ヒトCYP24の発現調節におけるmicroRNAの役割の研究。CYP24 mRNAのMRE125bはmiR-125bに対して全体的な相補性は低いものの、seed sequenceが完全に相補的である。このため、

miR-125b が CYP24 の MRE125b を標的として認識し、ルシフェラーゼ活性の変動が認められたと考えられる。pGL3/UTR2 において大きな活性の低下が認められたため、miR-125b は CYP24 mRNA 全長に対しても機能的に働くことが示唆された。本研究においても 25(OH)D<sub>3</sub> を基質とした場合、CYP27B1 の代謝物である 1 $\alpha$ , 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> の生成は認められずこれらの報告と一致した。このことから、MCF-7 細胞においては 25(OH)D<sub>3</sub> から 1 $\alpha$ , 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> への経路を考える必要がなく、CYP24 活性を評価できたと考えられる。

(3-3) ヒト肝臓における Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) の microRNA による発現制御: PPAR $\alpha$  の 3'-UTR (8376 塩基) に相補的な miRNA をコンピューター解析により探索した結果、いくつかの miRNA が挙げられた。本研究では肝臓に豊富に発現している 6 種の miRNA に注目して検討した。HuH7 細胞に 6 種の pre-miRNA を導入した時、pre-miR-21 および pre-miR-27b の導入により有意な PPAR $\alpha$  タンパク質の低下が認められた。このことから miR-21 および miR-27b が PPAR $\alpha$  の発現制御に関与していることが示唆された。本研究で明らかとなった機能的な MRE21\_1 は配列全体の相同性が miR-21 とかなり高い。一方で、今回候補となった 3'-UTR 内の MRE27b の中で、標的 mRNA の認識に重要である seed sequence との相同性が高い MRE27b\_5 は周辺の配列はそれほど相同性が高くないために機能的ではなかったのかもしれない。PPAR $\alpha$  の発現制御に MRE21\_1 が機能的に働いていることを明らかにした。また MRE27b は同定に至らなかったが、細胞株における検

討を考慮すると、miR-27b は PPAR $\alpha$  の発現制御に関与していると考えられる。本研究では PPAR $\alpha$  およびその下流遺伝子の発現制御という脂質代謝や異物代謝での miR-21 および miR-27b の新たな機能を明らかにした。

(3-4) ヒト肝臓における CYP2E1 の microRNA による発現制御: miR-378 による CYP2E1 発現調節が実際にヒト肝臓中でも起きている事象であるか、25 検体のヒト個人肝における CYP2E1 mRNA とタンパク質発現量および酵素活性、mature miR-378 発現量の相関関係を調べることで評価した。CYP2E1 mRNA 発現量とタンパク質発現量との間には正の相関関係が認められず、これは過去の報告 (Sumida et al., 1999) と一致するものであり、転写後調節の関与が支持された。また、miR-378 発現量と CYP2E1 タンパク質発現量および CYP2E1 翻訳効率との間に有意な逆相関が認められたことから、miR-378 による翻訳抑制がヒト肝における CYP2E1 の常在的な発現に寄与していることが示唆された。miR-378 は、癌遺伝子として機能することが示されてきたが、本研究では薬物動態分野および毒性学分野における miR-378 の新しい機能を明らかにした。

## E. 結論

過去 3 年間の関連分野の世界的動向と、本研究成果を鑑みて、我々は以下のように考える。反応性代謝物の *in vitro* での定量的予測試験系については、最近では、いずれの製薬会社の研究所でも測定されるようになった。しかし、この手法によっても開発の go or not go を決定できないグレーゾーンが広いために、明確